

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Mitsuo OCHI, et al.

SERIAL NO: New Application

FILED: Herewith

FOR: BASE MATERIAL FOR TISSUE REGENERATION, IMPLANT
MATERIAL, AND METHOD OF PRODUCING IMPLANT MATERIAL

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☒ Full benefit of the filing date of International PCT Application No. PCT/JP02/07532, filed July 25, 2002, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):
Application No. Date Filed
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

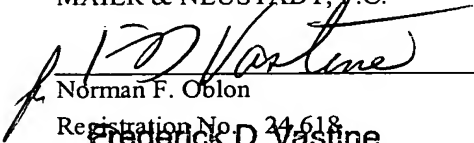
<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2001-230260	July 30, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
☐ are submitted herewith
☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.


Norman F. Oblon

Registration No. 24,618
Frederick D. Vastine
Registration No. 27,013

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

Translation of Priority Certificate

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application : July 30, 2001

Application Number : Patent Application 2001-230260

Applicant(s) : Mitsuo OCHI
Yoshito IKADA
JAPAN TISSUE ENGINEERING CO., LTD

October 21, 2003

Commissioner, Patent Office YASUO IMAI

Priority Certificate No. 2003-3086859



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 1 年 7 月 3 0 日
Date of Application:

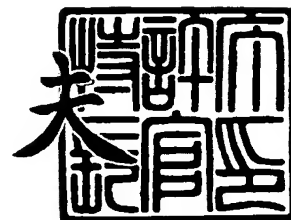
出 願 番 号 特 願 2 0 0 1 - 2 3 0 2 6 0
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 1 - 2 3 0 2 6 0]

出 願 人
Applicant(s): 越智 光夫
 筏 義人
 株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

2 0 0 3 年 1 0 月 2 1 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 PNJTA009

【提出日】 平成13年 7月30日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61L 27/00

【発明者】

 【住所又は居所】 広島県広島市安佐南区山本 2 - 1 1 - 3

 【氏名】 越智 光夫

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府宇治市五ヶ庄広岡谷 2 番地 1 8 2

 【氏名】 筏 義人

【発明者】

 【住所又は居所】 島根県出雲市白枝町 5 6 2 - 7 アドニス 1 0 1

 【氏名】 菅原 桂

【特許出願人】

 【識別番号】 599170434

 【氏名又は名称】 越智 光夫

【特許出願人】

 【識別番号】 591248131

 【氏名又は名称】 筏 義人

【特許出願人】

 【識別番号】 399051858

 【氏名又は名称】 株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

【代理人】

 【識別番号】 110000017

 【氏名又は名称】 特許業務法人アイテック国際特許事務所

 【代表者】 伊神 広行

 【電話番号】 052-218-3226

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 129482

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0102990

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 組織再生用基材、移植用材料及びその製法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 三次元形状に形成された多孔質担体と、
前記多孔質担体を囲うように形成され、前記多孔質担体を外部と連通した状態で支持する支持体と
を備えた組織再生用基材。

【請求項 2】 前記支持体は、網状支持体、柵状支持体又は穴付き板状支持体である

請求項 1 記載の組織再生用基材。

【請求項 3】 前記多孔質担体及び前記支持体のうち少なくとも一方は、生体親和性材料又は生体吸収性材料により形成されている

請求項 1 又は 2 記載の組織再生用基材。

【請求項 4】 前記多孔質担体はコラーゲン、コラーゲン誘導体、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸誘導体、キトサン、キトサン誘導体、ポリロタキサン、ポリロタキサン誘導体、キチン、キチン誘導体、ゼラチン、フィブロネクチン、ヘパリン、ラミニン及びアルギン酸カルシウムからなる群より選ばれた 1 種又は 2 種以上で形成され、前記支持体はポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体、ポリ乳酸ポリカプロラクトン共重合体及びポリグリコール酸ポリカプロラクトン共重合体からなる群より選ばれた 1 種又は 2 種以上で形成されている

請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の組織再生用基材。

【請求項 5】 前記支持体は、少なくとも 1 本の縫合糸が付されている

請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の組織再生用基材。

【請求項 6】 前記縫合糸は、生体親和性材料又は生体吸収性材料により形成されている

請求項 5 記載の組織再生用基材。

【請求項 7】 内視鏡下手術に使用可能な形状に形成されている

請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の組織再生用基材。

【請求項 8】 三次元形状に形成された多孔質担体と、
前記多孔質担体を囲うように形成され、前記多孔質担体を外部と連通した状態で支持する支持体と、
前記多孔質担体に保持された細胞と
を備えた移植用材料。

【請求項 9】 細胞を保持した状態で三次元形状に形成された細胞保持担体と、
前記細胞保持担体と隣接して三次元形状に形成された人工移植部材と、
前記細胞保持担体及び前記人工移植部材を囲うように形成され、少なくとも前記細胞保持担体を外部と連通した状態で支持する支持体と
を備えた移植用材料。

【請求項 10】 前記細胞は、軟骨細胞、骨芽細胞、骨細胞及びこれらの前駆細胞、並びに、間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）の少なくとも 1 つを含む

請求項 8 又は 9 記載の移植用材料。

【請求項 11】 前記細胞は、前記多孔質担体の片側半分に保持された軟骨細胞と前記多孔質担体のもう片側半分に保持された骨芽細胞又は骨細胞である
請求項 8 記載の移植用材料。

【請求項 12】 前記人工移植部材は人工骨であり、前記細胞は軟骨細胞である

請求項 9 記載の移植用材料。

【請求項 13】 関節における骨・軟骨欠損部分の治療に用いられる
請求項 11 又は 12 記載の移植用材料。

【請求項 14】 前記支持体は、網状支持体、柵状支持体又は穴付き板状支持体である

請求項 8～13 のいずれかに記載の移植用材料。

【請求項 15】 前記担体及び前記支持体のうち少なくとも一方は、生体親和性材料又は生体吸収性材料により形成されている

請求項 8～14 のいずれかに記載の組織再生用基材。

【請求項 16】 前記担体はコラーゲン、コラーゲン誘導体、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸誘導体、キトサン、キトサン誘導体、ポリロタキサン、ポリロタキサン誘導体、キチン、キチン誘導体、ゼラチン、フィブロネクチン、ヘパリン、ラミニン及びアルギン酸カルシウムからなる群より選ばれた 1 種又は 2 種以上で形成され、前記支持体はポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトン及びポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体からなる群より選ばれた 1 種又は 2 種以上で形成されている

請求項 8 ～ 15 のいずれかに記載の移植用材料。

【請求項 17】 前記支持体は、少なくとも 1 本の縫合糸が付されている
請求項 8 ～ 16 のいずれかに記載の移植用材料。

【請求項 18】 前記縫合糸は、生体親和性材料又は生体吸収性材料により形成されている

請求項 17 記載の移植用材料。

【請求項 19】 内視鏡下手術に使用可能な形状に形成されている
請求項 8 ～ 18 のいずれかに記載の移植用材料。

【請求項 20】 請求項 8 ～ 19 のいずれかに記載の移植用材料を製造する方法であって、

請求項 1 ～ 7 記載の組織再生用基材の前記多孔質担体に目的とする細胞を保持するにあたり、間葉系幹細胞を分化させて前記細胞を得たあと該細胞の細胞懸濁液を前記多孔質担体に付与することにより前記細胞を前記多孔質担体に保持させるか、又は、間葉系幹細胞を含む細胞懸濁液を前記多孔質担体に付与したあと培養することにより前記細胞を前記多孔質担体に保持させる

移植用材料の製法。

【請求項 21】 請求項 11 記載の移植用材料を製造する方法であって、
請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の組織再生用基材の前記多孔質担体の片側半分の間葉系幹細胞を含む細胞懸濁液を付与したあと培養することにより前記片側半分に軟骨細胞を作製し、その後、前記多孔質担体のもう片側半分に予め間葉系幹細胞を分化させて得た骨芽細胞又は骨細胞を付与する

移植用材料の製法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、生体内外で細胞を培養又は再生させるための組織再生用基材及びそれを利用した移植用材料に関する。

【0002】**【従来の技術】**

近年、細胞を生体外（*in vitro*）で培養し、培養した組織を患者に適する技術が数多く報告されている。この場合、細胞は単体で培養されるばかりでなく、細胞増殖の足場（*Scaffold*）となる担体（組織再生用基材）に播種され、培養される場合が多い。殊に、厚みや高さを持たせた三次元形状の組織を作製するためには、担体は重要な役割を担うことになる。また、組織再生の足場となる担体を組織再生用基材として埋植し、自己治癒能力により生体内（*in vivo*）で組織を再生させる技術も確立されつつある。これらの技術は、再生医療又は組織工学（*Tissue Engineering*）と称され、注目を浴びている。

【0003】

このような担体あるいは組織再生用基材としては、生体適合性の良好な材料のものや、生体吸収性の材料のものが利用されている。例えば、コラーゲン、ヒアルロン酸、ポリロタキサン、ゼラチン、フィブロネクチン、ヘパリン、キチン、キトサン、ラミニン、アルギン酸カルシウム、ポリロタキサンヒドロゲル等が挙げられる。

【0004】**【発明が解決しようとする課題】**

しかしながら、これらの材料による組織再生用基材では強度が弱く、高さのあるものや、大きなもの、細長いもの等では十分な形状を保持することが困難である。さらに、組織再生用基材に十分な強度がないと培養時や移植時の取扱いが困難であり、操作性が悪く、作業や術者に負担が掛かる。

【0005】

本発明は上記従来技術の問題点を鑑み、取扱いが容易な組織再生用基材及び移植用材料を提供することを目的とする。また、そのような移植用材料の製法を提供することを別の目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段、発明の実施の形態及び発明の効果】

本発明の第1は、三次元形状に形成された多孔質担体と、前記多孔質担体を囲うように形成され、前記多孔質担体を外部と連通した状態で支持する支持体とを備えた組織再生用基材である。

【0007】

この組織再生用基材では、三次元形状に形成された多孔質担体が自らその形状を維持することが難しい場合であっても、支持体がこの多孔質担体を囲うように形成されているため、支持体によって多孔質担体の三次元形状は維持される。したがって、組織再生用基材の取扱いが容易である。また、支持体は多孔質担体を外部と連通した状態で支持しているため、この組織再生用基材を生体に移植した場合に周りの生体組織が支持体を介して多孔質担体にアクセスでき、生体組織へのなじみがよくなる。したがって、組織再生に用いるのに適している。

【0008】

この組織再生用基材は、そのまま生体組織に移植してもよいし、多孔質担体に細胞を保持させたあとに生体組織に移植してもよい。前者の場合、移植したあと周りの生体組織をなす細胞が支持体を介して多孔質担体に入り込んで増殖することにより生着する。後者の場合、移植先の生体組織に応じて多孔質担体に保持させる細胞の種類を決め、その細胞を多孔質担体に保持させておき、移植したあと周りの生体組織と多孔質担体に保持された細胞とが支持体を介してアクセスすることにより、比較的早くなじんで生着する。なお、後者の場合、多孔質担体の一部に細胞を保持させてもよいし全部に細胞を保持させてもよく、1種類の細胞を保持させてもよいし複数種類の細胞を保持させてもよい。

【0009】

この組織再生用基材において、前記多孔質担体は、内部に多数の小さな孔（空隙）を有する形状の担体を意味し、具体的にはスポンジ状、ハニカム状又はそれ

らと同等なものが挙げられるが、このうちスポンジ状が好ましい。また、その孔径は、細胞を保持できる大きさであれば特に限定されない。また、多孔質担体は三次元形状に形成されているが、三次元形状とは例えば円柱、多角柱、円錐、多角錐、円錐台、多角錐台、球などの立体形状のほか、耳殻などの生体部位の形状などが挙げられる。

【0010】

この組織再生用基材において、前記支持体は、前記多孔質担体の三次元形状を維持できるのであれば特に前記多孔質担体の全体を囲む必要はなく一部を囲むだけでもよい。また、前記支持体は、網状支持体、柵状支持体又は穴付き板状支持体であることが好ましい。この場合、多孔質担体を外部と連通した状態で支持するという機能を良好に発揮できる。

【0011】

この組織再生用基材において、前記多孔質担体及び前記支持体のうち少なくとも一方は、生体親和性材料又は生体吸収性材料により形成されていることが好ましく、前記多孔質担体及び前記支持体の両方ともこのような材料で形成されていることがより好ましい。この場合、移植後に生体組織が組織再生用基材を異物とみなすことが少ないため、組織再生に適している。特に生体吸収性材料を用いた場合には、移植後に分解吸収されるため、組織再生に特に適している。

【0012】

このような生体親和性材料又は生体吸収性材料としては、特に限定されることなく使用可能であるが、例えば前記多孔質担体についていえば、コラーゲン、コラーゲン誘導体、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸誘導体、キトサン、キトサン誘導体、ポリロタキサン、ポリロタキサン誘導体、キチン、キチン誘導体、ゼラチン、フィブロネクチン、ヘパリン、ラミニン及びアルギン酸カルシウムからなる群より選ばれた1種又は2種以上が好ましく、前記支持体についていえば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリカプロラクトン、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体、ポリ乳酸ポリカプロラクトン共重合体及びポリグリコール酸ポリカプロラクトン共重合体からなる群より選ばれた1種又は2種以上が好ましい。

【0013】

この組織再生用基材において、前記支持体は、少なくとも1本の縫合糸が付されていることが好ましい。この場合、移植先の生体組織にこの縫合糸を用いて固定することができる。この縫合糸は、前出の生体親和性材料又は生体吸収性材料により形成されていることが組織再生に適するため好ましく、また、支持体と同じ材質で形成されていることが製造しやすいため好ましい。

【0014】

この組織再生用基材は、移植先の生体組織周辺を切開したあと移植してもよいが、患者負担を考慮すれば内視鏡下手術を行うことが好ましいため、内視鏡下手術に使用可能な形状に形成されていることが好ましい。例えば、柱状であって断面の径が2～15mmのものが好ましい。

【0015】

本発明の第2は、三次元形状に形成された多孔質担体と、前記多孔質担体を囲うように形成され、前記多孔質担体を外部と連通した状態で支持する支持体と、前記多孔質担体に保持された細胞とを備えた移植用材料である。

【0016】

この移植用材料では、例えば三次元形状に形成された多孔質担体が細胞懸濁液や培地等により湿潤して自らその形状を維持することが難しくなったとしても、支持体がこの多孔質担体を囲うように形成されているため外観形状が崩れることはない。したがって、移植用材料の取扱いが容易である。また、支持体は多孔質担体を外部と連通した状態で支持しているため、この組織再生用基材を生体に移植した場合に周りの生体組織が支持体を介して多孔質担体にアクセスすることができ、周りの栄養分が支持体を介して多孔質担体に保持された細胞へ供給されるので、生体組織へのなじみがよくなる。したがって、組織再生に用いるのに適している。

【0017】

本発明の第3は、細胞を保持した状態で三次元形状に形成された細胞保持担体と、前記細胞保持担体と隣接して三次元形状に形成された人工移植部材と、前記細胞保持担体及び前記人工移植部材を囲うように形成され、少なくとも前記細胞保持担体を外部と連通した状態で支持する支持体とを備えた移植用材料である。

【0018】

この移植用材料では、例えば三次元形状に形成された細胞保持担体が自らその形状を維持することが難しい場合であったとしても、支持体がこの細胞保持担体を囲うように形成されているため外観形状が崩れることはない。したがって、移植用材料の取扱いが容易である。また、支持体は細胞保持担体を外部と連通した状態で支持しているため、この組織再生用基材を生体に移植した場合に周りの生体組織が支持体を介して細胞保持担体にアクセスすることができ、周りの栄養分が支持体を介して細胞保持担体に保持された細胞へ供給されるので、生体組織へのなじみがよくなる。したがって、組織再生に用いるのに適している。更に、種々の人工移植部材を適用することができる。なお、支持体は細胞保持担体のみならず人工移植部材も外部と連通した状態で支持してもよく、この場合には人工移植部材と生体組織とのなじみもよくなる。

【0019】

本発明の第2及び第3の移植用材料において、前記細胞は、表皮細胞、上皮細胞、角化細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、骨細胞、筋細胞、肝細胞、心筋細胞及びこれらの前駆細胞、並びに間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）のうち少なくとも1つを含むことが好ましく、軟骨細胞、骨芽細胞、骨細胞及びこれらの前駆細胞、並びに、間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）のうち少なくとも1つを含むことがより好ましい。なお、間葉系幹細胞やES細胞は未分化細胞のため、移植先の生体組織に応じた細胞へと分化させる。

【0020】

本発明の第2の移植用材料において、前記細胞は、前記多孔質担体の片側半分に保持された軟骨細胞と前記多孔質担体のもう片側半分に保持された骨芽細胞又は骨細胞であってもよい。この場合、関節等においては上層が軟骨組織で下層が骨組織であることから、骨・軟骨欠損部分の移植用として適している。なお、「片側半分」とは、必ずしも半分である必要はなく、軟骨細胞を保持する領域と骨芽細胞又は骨細胞を保持する領域とが境界部分でオーバーラップしなければどのような割合で分けてもよい。

【0021】

本発明の第 3 の移植用材料において、前記人工移植部材は人工骨であり、前記細胞は軟骨細胞であってもよい。この場合も、関節等においては上層が軟骨組織で下層が骨組織であることから、骨・軟骨欠損部分の移植用として適している。

【0 0 2 2】

本発明の第 2 の移植用材料において、前記多孔質担体は、内部に多数の小さな孔（空隙）を有する形状の担体を意味し、具体的にはスポンジ状、ハニカム状又はそれらと同等なものが挙げられるが、このうちスポンジ状が好ましい。また、その孔径は、細胞を保持できる大きさであれば特に限定されない。本発明の第 3 の移植用材料において、前記細胞保持担体は、内部に多数の小さな孔（空隙）を有する形状の多孔質担体に限定されず、細胞を包埋した状態のゲル状、又はこれらと同等なものも利用できる。また、本発明の第 2 及び第 3 の移植用材料において、前記支持体は、前記担体の三次元形状を維持できるのであれば、特に前記担体の全体を囲む必要はなく一部を囲むだけでもよい。この支持体は、網状支持体、柵状支持体又は穴付き板状支持体であることが好ましい。この場合、担体を外部と連通した状態で支持するという機能を良好に発揮できる。更に、前記担体及び前記支持体のうち少なくとも一方は、生体親和性材料又は生体吸収性材料により形成されていることが好ましく、前記担体及び前記支持体の両方ともこのような材料で形成されていることがより好ましい。この場合、移植後に生体組織が組織再生用基材を異物とみなすことが少ないため、組織再生に適している。特に生体吸収性材料を用いた場合には、移植後に分解吸収されるため、組織再生に特に適している。このような生体親和性材料又は生体吸収性材料の例示は前出の通りである。更にまた、前記支持体は、少なくとも 1 本の縫合糸が付されていることが好ましい。この場合、移植先の生体組織にこの縫合糸を用いて固定することができる。この縫合糸は、支持体と同じ材質で形成されていることが好ましい。

【0 0 2 3】

本発明の第 2 及び第 3 の移植用材料は、移植先の生体組織周辺を切開したあと移植してもよいが、患者負担を考慮すれば内視鏡下手術を行うことが好ましいため、内視鏡下手術に使用可能な形状に形成されていることが好ましい。例えば、柱状であって断面の径が 2 ～ 1 5 mm のものが好ましい。

【0024】

本発明の第4は、移植用材料を製造する方法であって、前記組織再生用基材の前記多孔質担体に目的とする細胞を保持するにあたり、間葉系幹細胞を分化させて前記細胞を得たあと該細胞の細胞懸濁液を前記多孔質担体に付与することにより前記細胞を前記多孔質担体に保持させるか、又は、間葉系幹細胞を含む細胞懸濁液を前記多孔質担体に付与したあと培養することにより前記細胞を前記多孔質担体に保持させるものである。

【0025】

こうすれば、移植時の患者負担を軽くすることができる。また、移植用材料の製法としては、移植先の生体組織の周辺から組織を採取してその細胞を培養して多孔質担体に保持させることも考えられるが、その場合には患者負担が大きくなるため好ましくない。例えば、関節軟骨部の治療の場合、培養に供するための軟骨細胞を得るために、非荷重部ではあるが、健常部の軟骨組織を採取する必要がある。これを回避すべく、患者の骨髓細胞を採取してそこから得られる未分化の間葉系幹細胞を目的とする細胞（移植先の生体組織に適合する細胞）へ分化させることが好ましい。なお、間葉系幹細胞は移植したあと周りの生体組織をなす細胞へと分化するため、多孔質担体の間葉系幹細胞を保持させてそれを移植してもよい。

【0026】

また、組織再生用基材の多孔質担体の片側半分に軟骨細胞を保持し、もう片側半分に骨芽細胞又は骨細胞を保持した移植用材料を製造するには、

- ①多孔質担体の片側半分に間葉系幹細胞を含む細胞懸濁液を付与して多孔質担体上で培養することにより軟骨細胞を作製したあと、もう片側半分に予め間葉系幹細胞を分化させて得た骨芽細胞又は骨細胞を付与する方法、
- ②多孔質担体の片側半分に間葉系幹細胞を含む細胞懸濁液を付与して多孔質担体上で培養することにより軟骨細胞を作製したあと、もう片側半分に間葉系幹細胞を含む細胞懸濁液を付与して多孔質担体上で培養することにより骨芽細胞又は骨細胞を作製する方法、
- ③多孔質担体の片側半分に予め間葉系幹細胞を分化させて得た軟骨細胞を付与し

たあと、もう片側半分に予め間葉系幹細胞を分化させて得た骨芽細胞又は骨細胞を付与する方法、

④多孔質担体の片側半分に予め間葉系幹細胞を分化させて得た軟骨細胞を付与したあと、もう片側半分に間葉系幹細胞を含む細胞懸濁液を付与して多孔質担体上で培養することにより骨芽細胞又は骨細胞を作製する方法、

あるいは、

①～④において軟骨細胞と骨芽細胞を作製する順序を入れ替えた方法などが挙げられる。

【0027】

但し、間葉系幹細胞から軟骨細胞を作製する方が、間葉系幹細胞から骨芽細胞を作製するよりも一般的に難しいため、先に軟骨細胞を作製する方が好ましい。また、移植用材料においては、移植部位で産生されている基質と同等のものを有していることが治療を促進する上で重要である。これを鑑みると、予め間葉系幹細胞を分化させて得た軟骨細胞を多孔質担体へ付与する場合には、細胞を付与した後に、基質を産生させるために更なる培養を行う必要がある。さらに、関節部の軟骨組織は硝子様軟骨の形質を有しているが、培養操作によって軟骨細胞を硝子様軟骨の性質を持たせるためには、多孔質担体等に細胞を付与して三次元的に培養する必要がある。つまり、このような場合においては、間葉系幹細胞から軟骨細胞を得るための培養工程に加えて、軟骨細胞に基質を産生させたり、硝子様軟骨を形成させたりするというような更なる培養工程が必要となる（２段階の培養工程）。これに対して、間葉系幹細胞を含む細胞懸濁液を多孔質担体へ付与して多孔質担体上で培養する場合には、多孔質担体上において、間葉系幹細胞による細胞増殖と、硝子様軟骨への分化による基質産生とが行われるため、１段階の培養工程で済む。このため、後者の方が好ましい。つまり、上記①～④でいえば、①、②の方が③、④よりも好ましい。

【0028】

【実施例】

【0029】

【実施例１】組織再生用基材

図1は組織再生用基材の概略斜視図である。組織再生用基材10は、円柱形状のコラーゲンスポンジ11と、このコラーゲンスポンジ11の外周を囲うように形成された網状支持体12とを備えている。網状支持体12は、PLGA（ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体）製であり、網目を介してコラーゲンスポンジ11を外部と連通した状態で支持している。この組織再生用基材10の大きさは、外径6mm、高さ15mmである。

【0030】

[実施例2] 移植用材料ーその1

図2は本実施例の移植用材料の概略斜視図、図3は本実施例の移植用材料を作製する手順を表す概略説明図である。本実施例では、図2に示すように、実施例1の組織再生用基材10を細胞増殖の足場とし、コラーゲンスポンジ11の半分の領域11aにて軟骨細胞を保持し、他の半分の領域11bにて骨芽細胞を保持している構成の移植用材料（以下、骨・軟骨柱という）20を作製した。以下、図3に基づいてその作製手順を説明する。

【0031】

まず、日本白色家兎の頸骨から、ヘパリンを少量含むシリンジで吸引することで骨髓細胞を得た（図3（a）参照）。これを10%FBS（ウシ胎児血清）を含有するDMEM（ダルベッコ変法イーグル培地）で10倍に希釈し、細胞懸濁液を作製した。このときのDMEMには抗生物質を添加したものを使用した。この細胞懸濁液を10cmディッシュへ10ml播種し、37℃、5%CO₂下で1週間培養した。1週間の培養の後、培地交換を行った。骨髓細胞は、血球系細胞と間葉系幹細胞とから構成されており、この培地交換によって浮遊型の血球系細胞のみが除去され、ディッシュ底面に付着する接着依存型の間葉系幹細胞のみを得ることができた。最初の培地交換の後、3～4日毎に培地交換を行い、間葉系幹細胞を増殖させた（図3（b）参照）。また、十分な量の細胞数が得られるまでは、必要に応じて継代培養を行った。このように、継代培養によって十分な量の間葉系幹細胞が得られるが、間葉系幹細胞がディッシュの培養面全面に至るまで増殖する（コンフルエント）と分化し始めるため、細胞がコンフルエントな状態まで増殖しないようにし、間葉系幹細胞の未分化な状態を保つようにした。

【0032】

充分量の間葉系幹細胞を得た後、5分間のトリプシン処理により間葉系幹細胞をディッシュ底面から剥離した。剥離処理の後、1500 rpm、5分間の遠心処理を行い、間葉系幹細胞のペレットを軟骨誘導培地に懸濁して、 4×10^7 cells/ml 以上の細胞密度の細胞懸濁液を調製した。軟骨誘導培地としては、DMEMに 10^{-8} Mのデキサメタゾン (Dexamethasone)、 10^{-5} Mの β -グリセロフォスフェート (β -Glycerophosphate)、0.05 mg/mlのアスコルビン酸-2 フォスフェート (Ascorbic Acid 2-Phosphate) 及び抗生物質を添加した無血清培地を使用した。

【0033】

滅菌したシリコンチューブ (外径10 mm, 内径6 mm, 高さ7 mm) を24 ウェル・プレートに立て、上述の組織再生用基材10をシリコンチューブ内に挿入し、シリコンチューブにより組織再生用基材10を直立した状態で支持した (図3 (c) 参照)。上述のように調製した細胞懸濁液 (間葉系幹細胞+軟骨誘導培地) をエッペンドルフピペットにて組織再生用基材10のコラーゲンスポンジ11の上方から100 μ l 滴下した。100 μ l を滴下すると、細胞懸濁液はコラーゲンスポンジ11の上部分のみに浸透してこの部分に間葉系幹細胞が接着し、下半分には細胞が存在しない状態となった。この状態の組織再生用基材10を細胞播種部分が下になるように倒置し、倒置前と同様にシリコンチューブで直立状態に支持した。倒置後1時間を経過させることで間葉系幹細胞を組織再生用基材10に接着させた後、上述と同様の成分からなる軟骨誘導培地を1.5 ml 注入し、37℃、5% CO₂条件下で2週間培養した。この間の培地交換は隔日 (一日おき) で行った。このときの組織再生用基材10をホルマリンで固定し、パラフィン包埋後組織切片を作製し、軟骨基質を染色するアルシアンブルー染色法により断面染色像を作成した。この断面染色像を観察したところ、軟骨細胞が特異的に産生する酸性ムコ多糖類が染色されており、間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化が適切に行われていることが確認できた。

【0034】

一方、一部の10cmディッシュにおいて、間葉系幹細胞をコンフルエントな状態になるまで培養した。間葉系幹細胞がコンフルエントな状態になった後、培地を細胞増殖用のものから骨分化培地に切換え、37℃、5%CO₂条件下で2週間培養し、骨芽細胞へと分化させた(図3(d)参照)。骨分化培地としては、10%含有DMEMに10⁻⁷Mのデキサメタゾン、0.15mMのアスコルビン酸-2フォスフェート、1mMのビルビン酸、10ng/mlのrh TGF-β1 (recombinant human TGF-β) 及び1/100 vol (培地量の1/100量に相当)のITSプレミックス (ITS premix; 日本ベクトンディッキンソン社製) を添加したものを使用した。

【0035】

分化させた骨芽細胞をトリプシンおよびコラゲナーゼ処理によりディッシュ底面より剥離し、2×10⁷ cells/mlの細胞密度となるように抗生物質+10%FBS/DMEMにて骨芽細胞懸濁液を調製した。この骨芽細胞懸濁液を、軟骨細胞がコラーゲンスポンジ11の半分の領域に形成されている組織再生用基材10に滴下した。この際、軟骨細胞が保持されている側とは、反対側の端部から骨芽細胞懸濁液を滴下した(図3(e)参照)。滴下後1時間静置することで、骨芽細胞をコラーゲンスポンジ11に保持させた。これにより、図2に示すように、コラーゲンスポンジ11の半分の領域11aにて軟骨細胞を保持し、他の半分の領域11bにて骨芽細胞を保持している構成の骨・軟骨柱20が得られた。

【0036】

また、骨芽細胞を播種した後、抗生物質を添加した10%FBS含有DMEMで培養することで骨芽細胞から基質を産生させることにより、コラーゲンスポンジ11の半分の領域11aにて軟骨細胞を保持し、他の半分の領域11bにて骨細胞を保持している構成の骨・軟骨柱20を作製した。

【0037】

[実施例3] 移植用材料-その2

図4は本実施例の移植用材料の概略斜視図、図5は本実施例の移植用材料を作

製する手順を表す概略説明図である。本実施例では、図4に示すように、軟骨細胞を保持したコラーゲンゲル31と、このコラーゲンゲル31に積層された人工骨33と、これらを囲うように形成された網状支持体32とを備えた移植用材料である骨・軟骨柱30を作製した。以下、図5に基づいてその作製手順を説明する。

【0038】

まず、滅菌したシリコンチューブ（外径10mm，内径6mm，高さ15mm）を24ウェル・プレートに立て、PLGA（ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体）で形成された網状支持体32（直径6mm，高さ15mm）をシリコンチューブ内に挿入し、シリコンチューブにより網状支持体32を直立した状態で支持した（図5（a）参照）。

【0039】

次いで、リン酸カルシウム化合物を主成分とするペースト状の骨充填材（商品名バイオベックス、三菱マテリアル社製）200 μ lを周囲がシリコンチューブに囲まれている状態にある網状支持体32内に充填した。この時の骨充填材の高さは約7mmであった。骨充填材の充填後、約10分間静置することで骨充填材が硬化してヒドロキシアパタイトつまり人工骨33が形成された（図5（b）参照）。

【0040】

一方、日本白色家兎の関節部から軟骨組織を採取し、トリプシンEDTA溶液およびコラゲナーゼ溶液で酵素処理を行い、軟骨細胞を分離・回収した。得られた軟骨細胞を洗浄した後、10%FBSを含有するDMEMを加え、細胞密度が 4×10^6 個/mlとなるように細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液と3%アテロコラーゲンインプラント（高研社製）が1：1の割合になるよう混合し、軟骨細胞－コラーゲン混合液を調製した。この混合工程により、 4×10^6 個/mlだった細胞密度は、 2×10^6 個/mlに希釈された。この細胞－コラーゲン混合液200 μ lを前述した網状支持体32内の人工骨33上に充填した。この軟骨細胞－コラーゲン混合液充填の際、フィブロネクチン等の接着因子を人工骨33上に載置した。

【0041】

その後、37℃、5%CO₂の条件下で1時間静置して軟骨細胞－コラーゲン混合液をゲル化させ、軟骨細胞に基質を産生させるべく培地を加えて3週間培養し、骨・軟骨柱を得た。このときの培地には、50μg/ml アスコルビン酸を含有する10% FBS－DMEMを使用した。

【0042】

[実施例4] 骨・軟骨柱の評価

実施例2で得た骨・軟骨柱（半分が軟骨組織、他の半分が骨芽組織）を実際にウサギの骨・軟骨欠損部分に移植して修復程度を評価した。即ち、日本白色家兎（27週齢）を麻酔したのちに膝関節部分を切開し、膝蓋骨を脱臼させた。次いで大腿骨を露出し、膝蓋溝中央にドリルで直径5mm、深さ3mmの一部欠損を作製した。この欠損部の深さに適合するように実施例2で得た骨・軟骨柱20を切って骨・軟骨欠損部に埋め込み、PLGA製の網状支持体12のメッシュ部分に同じくPLGA製の縫合糸をかけて周囲の健全軟骨部分と縫着して固定した。コントロール群としては細胞を播種していない組織再生用基材10を骨・軟骨欠損部に埋め込み、同様に周囲の健全部分と縫着して固定した。いずれも、手術部位周辺部を抗生物質を含んだ生理食塩水で洗浄したのち、切開部を縫合した。また、いずれも十分な強度を有しており、形状が崩れることがなく容易に取り扱うことができた。

【0043】

これらのウサギを84日間飼育したのち麻酔下にて屠殺し、移植部を含む大腿骨膝関節部分を切離し組織標本作製し、この組織標本をホルマリン固定後、組織切片を作製しアルシアンブルー染色、サフラニンO染色による組織学的観察を行った。その結果、骨・軟骨柱移植群において欠損部はアルシアンブルー染色およびサフラニンO染色で陽性に染まっており、骨・軟骨柱による骨組織及び軟骨組織の再生が認められた。コントロール群においては再生が認められなかった。なお、更に長期に飼育した場合にはコントロール群においても周囲健全部から細胞が入り込んで修復されると思われる。

【0044】

上記と同様に、実施例 3 で得た骨・軟骨柱 30（半分が軟骨組織、他の半分が人工骨）を実際に兎の骨・軟骨欠損部分に移植して修復程度を評価したところ、移植後 84 日後のウサギの骨・軟骨柱移植分における欠損部で修復が認められた。

【0045】

なお、本発明は上記実施例に何等限定されるものではなく、本発明の技術的範囲を逸脱しない範囲内において、種々なる形態で実施し得ることは勿論である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 1 の組織再生用基材の概略斜視図である。

【図 2】

実施例 2 の移植用材料（骨・軟骨柱）の概略斜視図である。

【図 3】

実施例 2 の移植用材料（骨・軟骨柱）を作製する手順を表す概略説明図である。

【図 4】

実施例 3 の移植用材料（骨・軟骨柱）の概略斜視図である。

【図 5】

実施例 3 の移植用材料（骨・軟骨柱）を作製する手順を表す概略説明図である。

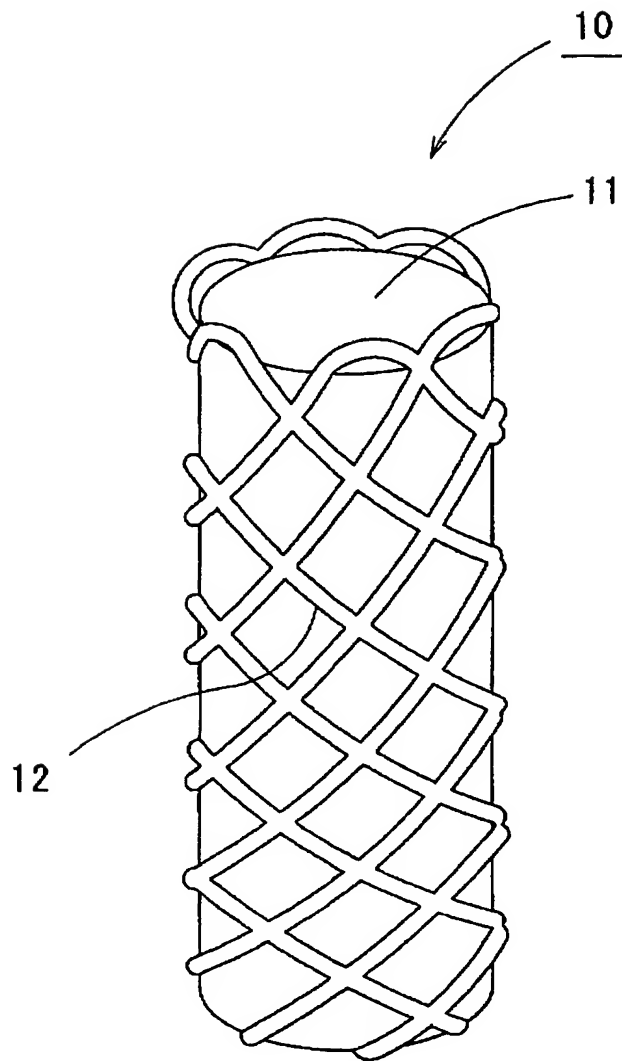
【符号の説明】

10…組織再生用基材、11…コラーゲンスポンジ、11a…軟骨細胞を保持した領域、11b…骨芽細胞を保持した領域、12…網状支持体、20…骨・軟骨柱、30…骨・軟骨柱、31…コラーゲンスポンジ、32…網状支持体、33…人工骨。

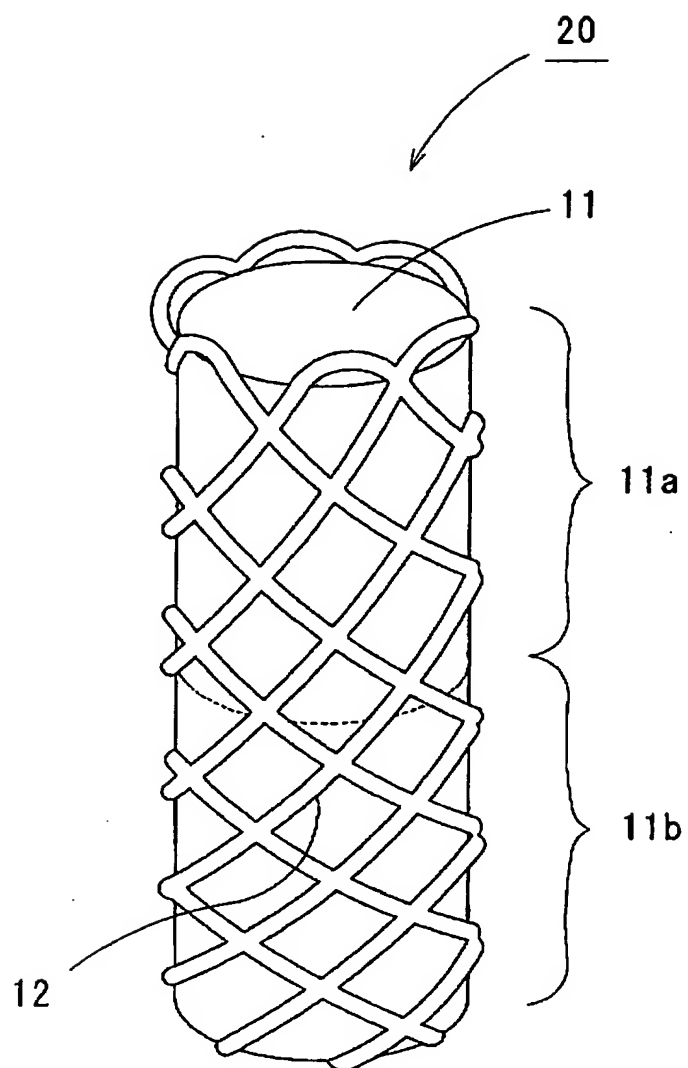
【書類名】

図面

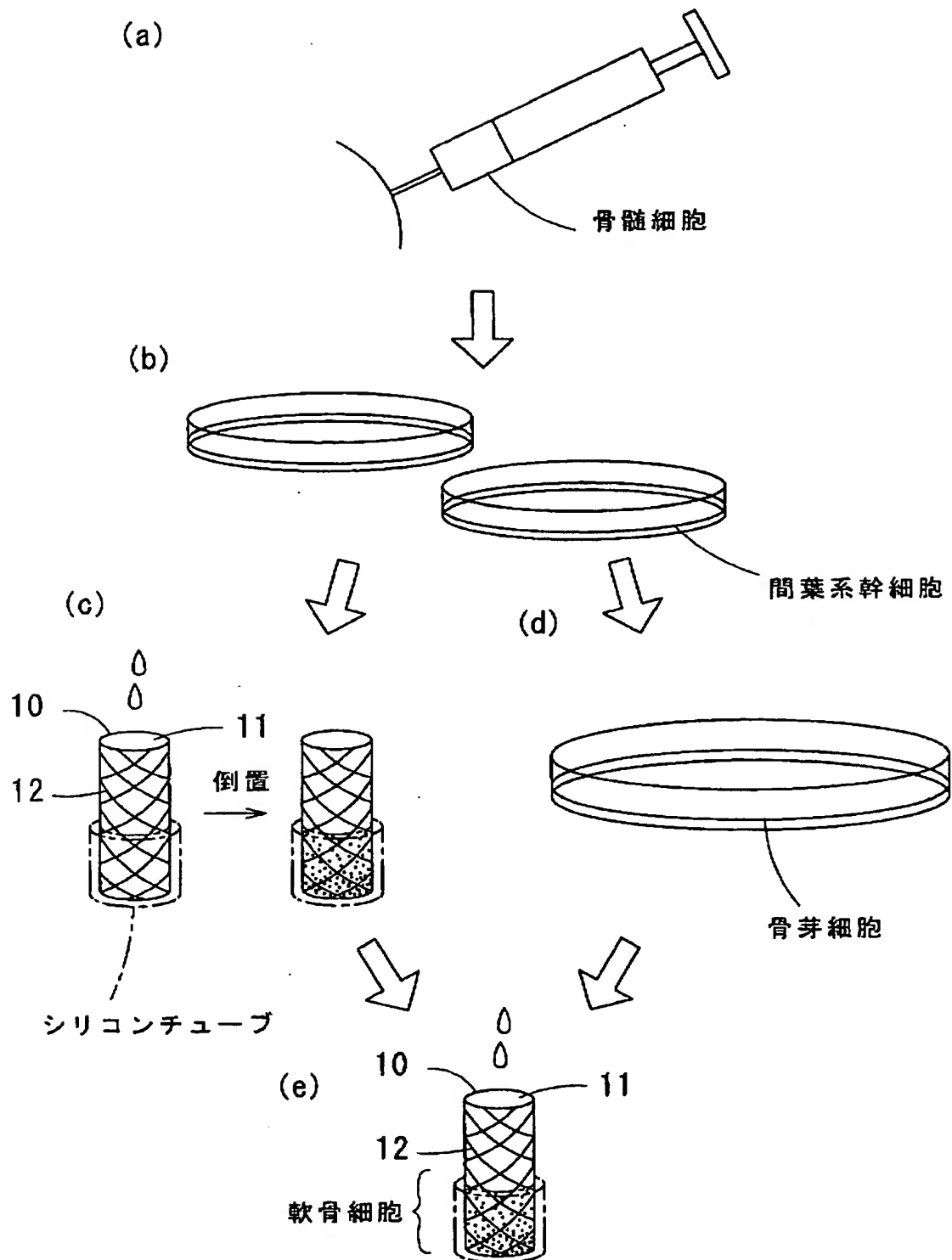
【図 1】



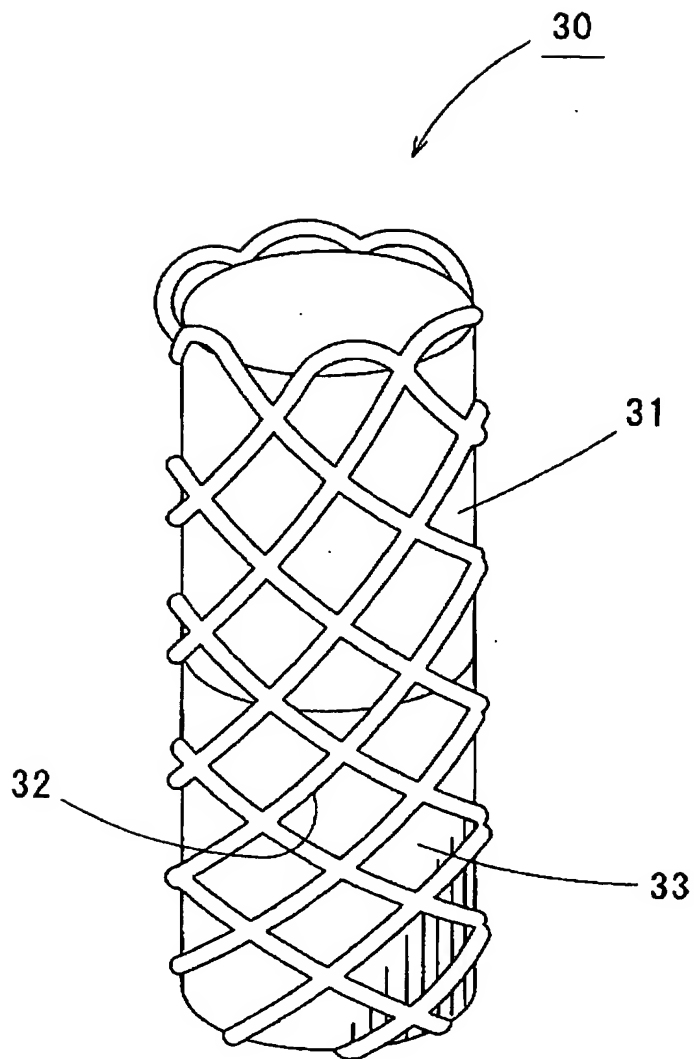
【図 2】



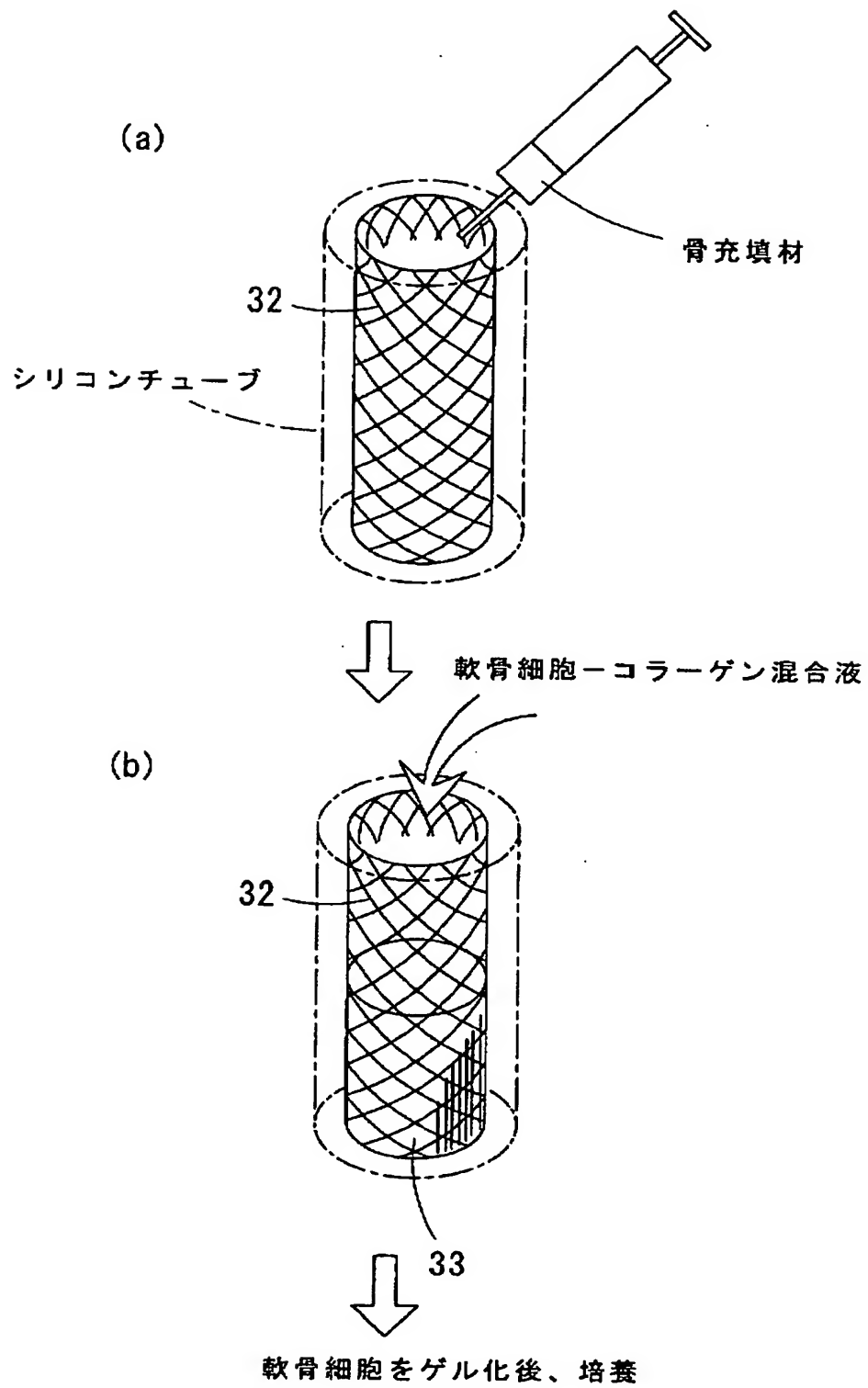
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 取扱いが容易な組織再生用基材及び移植用材料を提供する。

【解決手段】 組織再生用基材 10 は、三次元形状に形成されたコラーゲンスポンジ 11 と、コラーゲンスポンジ 11 を外部と連通した状態で支持する網状支持体 12 とを備えている。この組織再生用基材 10 では、三次元形状に形成されたコラーゲンスポンジ 11 が自らその形状を維持することが難しい場合であっても、網状支持体 12 がこのコラーゲンスポンジ 11 を囲うように形成されているため、網状支持体 12 によってその三次元形状は維持される。したがって、組織再生用基材 10 の取扱いが容易である。また、網状支持体 12 はコラーゲンスポンジ 11 を外部と連通した状態で支持しているため、この組織再生用基材 10 を生体に移植した場合に周りの生体組織が支持体を介してコラーゲンスポンジ 11 にアクセスでき、生体組織へのなじみがよくなる。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 1 - 2 3 0 2 6 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 9 1 7 0 4 3 4]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 1 2 月 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

広島県広島市安佐南区山本 2 - 1 1 - 3

氏 名

越智 光夫



特願 2 0 0 1 - 2 3 0 2 6 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 1 2 4 8 1 3 1]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 1 0 月 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府宇治市五ヶ庄広岡谷 2 番地 1 8 2

氏 名

筏 義人

特願 2 0 0 1 - 2 3 0 2 6 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 9 0 5 1 8 5 8]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 8 月 2 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県蒲郡市三谷北通 6 丁目 2 0 9 番地の 1

氏 名

株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング